



Jan Dvořák Ph.D.
Tel.: +420 241 063 101
Mobile: +420 777562131
Email: jan.dvorak@img.cas.cz

Institute of Molecular Genetics of the ASC
Videňská 1083
Prague 4, CZ-14220 Czech Republic

Posudek diplomové práce: Scavenger receptor – trypsinová peptidáza IrSRP-1 z klíštěte *Ixodes ricinus*

Oponent: Jan Dvořák
Ústav molekulární genetiky AV ČR,
Videňská 1083
142 20 Praha 4

Autor: Barbora Singerová
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce je zaměřena na velmi zajímavé téma a to na multidoménovou molekulu z klíštěte *I. ricinus* - scavenger receptor a jeho součást trypsinovou peptidázu (proteázu) pojmenovanou IrSRP-1. Téma práce je zvoleno velmi dobře, a přestože se jedná o velmi komplexní problematiku, má vynikající potenciál pro další navazující výzkum. Cíle práce jsou dobře a logicky nastaveny a z velké části se je podařilo splnit, což není pravidlem u všech diplomových prací. Na práci je evidentní, že je podložena značným pracovním nasazením, a že si autorka osvojila řadu laboratorních metod. Je též patrné, že autorka měla kvalitní vedení a zájem. Nemám sebemenší pochyby o tom, že touto prací autorka splnila kritéria kladenou na diplomovou práci. Přesto mám několik připomínek a dotazů, které zde rozvádím v komentáři k vlastnímu textu.

Literární přehled: Je podle mého názoru výborně napsaný. Je věcný a problematiku, i když nejsem přímo expertem na scavenger receptory, si myslím vysvětluje dostatečně přehledně. Zároveň nezabíhá do nepodstatných obecně známých detailů, jak je často diplomových prací běžné. Literární přehled je opravdu zdařilou částí práce. V přehledu vidím jediný větší nedostatek; chybí mi detailnější rozbor problematiky proteáz. Možná vysvětlení a několik citací prací pojednávajících o příbuzných proteázách by bylo vhodné. Toto se pak objevuje až v diskuzi.

Materiál a metody: Přes nespornou kvalitu kapitoly bych možná ocenil přehledné schéma molekuly, a příslušných primerů. Nicméně je to spíše detail a osobní názor. Našel jsem několik nejasností, které uvádím v dotazech níže. Doporučuje se také používat termín RT-qPCR, jak jsem se recentně sám poučil z oponentských posudků.

Výsledky: Kapitola je koncipována přehledně a objasňuje celkem jasně získaná data. Mé výtky, či spíše dotazy jsou uvedeny níže.

Diskuze: Na můj vkus je dosti rigidní a na počátku připomíná literární úvod. Diskuze též nemusí kopírovat pořadí výsledků. Přesto je však pojata dostatečně, když je obecně těžké hluboce hypotetizovat nad něčím, co je studováno doposud velmi málo.

Otázky:

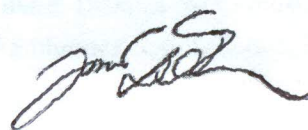
1. Je opravdu opravdu kvantifikovatelný postup na SDS-PAGE vzhledem k množství proteinu?, cituji: „Standardně se používalo ředění odpovídající zhruba 1/5 střeva a 2/3 vaječníků, trachejí nebo malpighických trubic z 1 samice na jednu jamku.“
2. Jak byly testovány navržené primery na kvantitativní PCR. Bylo testováno více párů?
3. Proč nebyla případná proteolytická aktivita rekombinantu po refoldingu testována fluorometricky pomocí běžných peptidových substrátů pro trypsinové proteázy? Je mléčný kasein opravdu univerzální substrát pro všechny proteázy z rodiny S1 s aktivitou trypsinového typu?
4. Je fixační roztok obsahující formaldehyd a glutaraldehyd vhodný pro membránové proteiny?
5. Jakým způsobem byl vybrán úsek pro konstrukci dsRNA?
6. Jak je možné interpretovat skutečnost, že pouze sání na krvi stimuluje transkripci IrSRP-1, zatímco sérum ne? Možná i přítomnost kvasinek má podle výsledků jistý vliv. Dalo by se jednoduše experimentálně testovat, co je stimulans? Například přidávání hemoglobinu nebo membránových frakcí do potravy pro sání? Navíc obrázek 6D, ukazuje zajímavou skutečnost, že nástup upregulace u krmených klíšťat sérem je rychlejší, ale záhy se utlumuje, nebo spíše fluktuuje na stejné zvýšené hladině. Pokud tam není korelace k sání, jak je to komentováno ve výsledcích. Co by to mohlo být? Při předpokladu, že vybraný housekeeping gen je relevantní pro normalizaci.
7. Proč byly pro western blot použity polonasáté samice, když expresní profil naznačuje výrazný nárůst po plném nasátí. Je proto nějaký metodický důvod? Ve stejnou dobu sání byly samice byly použity i pro RNAi analýzy, důvod je jaký?.
8. Přesto, že se to běžně stává, mohla by autorka lépe vysvětlit konkrétní rozpor mezi western blotem a imunolokalizací?

Závěr:

Vědeckou práci Barbora Singerová a její výslednou sepsanou diplomovou práci hodnotím velmi kladně. Navrhuji proto jednoznačně práci k přijetí. Obhajoby se bohužel nemohu osobně zúčastnit, ale na základě předložené práce navrhuji hodnocení 1. Práce je na vysoké úrovni a jistě bude základem kvalitní vědecké publikace.

dne 9.1. 2014

Jan Dvořák



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Barbory Singerové s názvem Scavenger receptor – trypsinová peptidáza IrSRP-1 z klíštěte *I. ricinus*

Magisterská práce Barbory Singerové je věnována strukturní a funkční analýze multidoménového proteinu z klíštěte *Ixodes ricinus*. Práce má 40 stran bez seznamu referencí a po formální stránce obsahuje všechny náležitosti, jaké má magisterská práce obsahovat.

Rozsah jednotlivých částí je adekvátní. Projdu postupně celou práci, na tučně zvýrazněné věty bych rád slyšel odpověď.

V úvodu autorka představuje proteinovou skupinu scavenger receptorů z hlediska jejich rozdělení, struktury i funkce. Dle mého názoru by si zasloužil víc prostoru detailnější popis funkce, tj. toho, jakým způsobem scavenger receptory fungují na molekulární úrovni. Určitě by se to později hodilo pro diskuzi možné funkce jednotlivých domén zkoumaného proteinu. **Například by mě zajímalo, jakou funkci mají scavenger receptory, např. CD163, v rozpuštěné formě.** Na straně 4, druhém řádku, píše autorka o CD36 receptoru z krevničky. Zde by mělo být uvedeno CD36-like receptor. Je třeba dbát na přesnost, jelikož označení CD se užívá pouze pro lidské antigeny, případně jejich homology v jiných savcích.

Část věnovaná metodám je zpracována velice podrobně, což oceňuji. Všiml jsem si ale některých formulací, které mi nepřijdou úplně přesné. Na straně 13 autorka píše, že byla nanášena na kolonu france inkluzních tělísek. To není přesné. **Jak by to mělo být správně a co jsou inkluzní tělíčka?**

Výsledkům se chci věnovat nejpodrobněji. Na úvodním obrázku na straně 20 mě zaujala vysoká teplotní specifita, kdy do 60 C neprobíhá amplifikace vůbec, při 63 stupních je reakce nespecifická a až při 65 stupních se amplifikuje správný produkt. Přijde mi to překvapivé. **Nebo je to obvyklé při tomto typu PCR?** Zkoumaný protein má mnoho funkčních domén. Přes neúspěch při 5 RACE PCR bych se rád zeptal, **kde autorka předpokládá lokalizaci proteinu.** Předpokládal bych membránovou lokalizaci, ale z obr. 9 je spíš vidět lokalizace intracelulární.

Rád bych viděl alignment nebo postup, jak byla vytvořena hybridní molekula, jak byly určeny předpokládané domény, není mi totiž jasné, z čeho lze přítomnost jednotlivých domén odhadnout. Je jejich složení a počet u homologů konzervativní?

Úplně přesně jsem nepochopil interpretaci qPCR dat. Jedná se o relativní qPCR, měl by být tedy uveden vedle referenčního genu i kalibrátor. **Jaký vzorek tedy představuje v analýze 100%?**

Na obr. 7 je SDS PAGE z chromatografie. Nesedí mi odhadovaná velikost proteinu (32kDa) s velikostí na gelu (cca 50kDa). **Čím si autorka vysvětluje rozdíl?**

K RNA interferenci. **Je rozdíl v hmotnosti signifikantní?** Bohužel je uvedena pouze průměrná hodnota bez rozptylu a bez statistického vyhodnocení, takže nelze posoudit o jak výrazný rozdíl se jedná.

Zaujala mě existence proteinů z enzymatickou doménou. **Je znám nějaký příklad podobného multidoménového proteinu s proteázovou doménou, u kterého by byla popsána detailně funkce jednotlivých domén? Např. zmiňovaný hepsin?** Autorka vždy popisuje kde se protein vyskytuje a jakých procesů se účastní, ale nikde nezmiňuje, jak takový protein pracuje. Proto se ptám, zda se to alespoň u nějakých podobných proteinů ví.

Autorka píše, že dle WB analýzy bylo nejvíc protienů ve střevech atd. Byla provedena densitometrie WB? Nelíbí se mi formulace v další větě ...hladina mRNA nebyla nulová, ale velmi nízká... Takových formulací by se autorka měla vystříhat, vždy je možné a vhodné uvést konkrétní hodnotu. Navíc, podle obr. 6A byla exprese mRNA obdobná jako u malpighických trubic, kde byl IrSRP pomocí WB detekován.

Celkově je práce napsána dobře a srozumitelně. Dle mého názoru, mohla být práce Barbory Singerové o trochu delší, zvláště uvedení do problematiky scavenger receptorů a popis jejich funkcí. Tvorba hybridního proteinu mohla být také popsána podrobněji. Analýza RNAi by si také zasloužila podrobnější rozebrání a některé údaje by měly být zhodnoceny statisticky (hmotnost samic a snůšky).

Práci doporučuji k obhajobě. Vzhledem k několika výše uvedeným výtkám navrhuji hodnocení 1-2 a přeji autorce při obhajobě mnoho zdaru.

V Drážďanech, 12.1.2014

RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.